



Patentdirektoratet
TAASTRUP

-
- | | | |
|---|---------------|----------------|
| (21) Patentansøgning nr.: 2030/82 | (51) Int.Cl.5 | C 12 N 1/00 |
| (22) Indleveringsdag: 06 maj 1982 | | C 12 N 1/20 |
| (41) Alm. tilgængelig: 09 nov 1982 | | // C 12 M 1:12 |
| (45) Patentets meddelelse bkg. den: 14 jun 1993 | | |
| (86) International ansøgning nr.: - | | |
| (30) Prioritet: 08 maj 1981 FR 8109153 | | |
| (73) Patenthaver: *Eurozyme; Zone d'activite de Buxieres; B.P. 10; 86220 Dange Saint-Romain, FR | | |
| (72) Opfinder: Jean *Amen; FR, Michel *Cabau; FR | | |

(74) Fuldmægtig: Hofman-Bang & Boutard A/S

(54) Fremgangsmåde til dyrkning af mikroorganismer i et podet kulturmedium

(56) Fremdragne publikationer

(57) Sammen drag: 2030-82

Dyrkning af mikroorganismer, eksempelvis mælkesyre bakterier, i et i forvejen podet kulturmedium, eksempelvis baseret på lactose og gærekstrakt, gennemføres ved, at man sætter næringssubstratet og et neutraliserende middel til fermenteringsbeholderen i afpassede mængder, idet man efter en begyndelsesfase med høj vækstrate gennem en ultrafiltreringsbehandling af kulturmediet opretholder en fastlagt koncentration i kulturmediet af det ved fermenteringen dannede inhiberende middel, eksempelvis mælkesyre, og kulturmediets rumfang holdes på et konstant niveau, som er mindre end maksimalniveauet, der nås ved afslutningen af begyndelsesfasen, og større end begyndelsesniveauet.

Der opnås høje udbytter udtrykt som bakterieriemasse af fermenteringsbeholderens rumfang.

Den foreliggende opfindelse angår en fremgangsmåde til dyrkning af mikroorganismer i et podet kulturmedium.

5 Dyrkningen af mikroorganismer kan gennemføres i et kulturmedium, som indeholder næringssubstrater fortyndet med vand. Dette kulturmedium podes først med mikroorganismer, der således udvikler sig i et omtrent lukket miljø, bortset fra tilførslen af et neutraliseringsmiddel (en såkaldt "batch"-kultur). Anvendt i industriel målestok udviser denne type fermentering den fordel, at den er enkel, men den har en lav effektivitet, fordi der forekommer begrænsende faktorer, dels i selve næringssubstratet, dels som de inhiberende stoffer, der produceres af mikroorganismene, og hvis stadig højere koncentration under fermenteringen har den virkning at mikroorganismernes vækst reduceres.

Man har for at afhjælpe denne ulempe foreslået at sikre en kontinuert fermentering, dvs. at tilvejebringe på én gang at sikre en afmålt fjernelse af kulturmediet samtidig med en ligeledes afmålt tilførsel af næringssubstrat, af neutraliseringsmiddel og af vand. Denne driftsmetode tillader at forbedre, for en fermenteringsbeholder med en given rumfangskapacitet, produktionen fra mikroorganismer; men dette sker på bekostning af en formindsket koncentration af mikroorganismene i den ekstrakt, som man gennemfører på kulturmediet, med deraf følgende forholdsvis ringe udbytte af mikroorganismer i forhold til næringssubstrat.

30 En anden arbejdsmetode består i, at man overfører det samme kulturmedium til en fermenteringsbeholder af en klart større størrelse end det oprindelige rumfang af kulturmediet, og at man på kontinuert måde tilsætter det med vand fortyndede næringssubstrat og neutraliseringsmidlet. Denne type fermentering (kaldet "feed batch"), som tillader formindskelse af den ugunstige virkning af

inhibitorerne ved at holde koncentrationen deraf på et begrænset niveau, udviser imidlertid den væsentlige ulempe, at den absolut nødvendiggør en fermenteringsbeholder af særdeles overdimensioneret kapacitet, således at denne
5 løsning kun sjældent er blevet anvendt i industrien.

Man har ligeledes foreslået at anvende dialysemembraner, som under visse betingelser tillader at fjerne de dannede
10 inhiberende midler og således at forøge slutkoncentrationerne af mikroorganismer i kulturmediet; men denne løsning er ikke blevet anvendt af industrien, eftersom sådanne membraner er alt for skrøbelige, såvel mekanisk, termisk som kemisk, fordi driftskontrollen deraf er vanskelig og kompleks, deres anvendelse ved varierende volu-
15 men er lidet ønskværdigt, og vægtudbyttet af fremstillede mikroorganismer i forhold til det til kulturmediet tilførte substrat stadig er beskedent.

Ultrafiltrerings-membranteknikken f.eks. beskrevet af
20 M.C. Porter og A.S. Michaels i Chemtech, januar 1972 pp. 56 tillod et fremskridt inden for fermentering af biologiske produkter gennem den tvungne passage af en recirkuleret mængde af det pågældende kulturmedium i en ultrafiltreringscelle, hvis karakteristika man kunne vælge på
25 en sådan måde, at man sikrede ekstraktionen af det eller de tilstedeværende inhiberende midler, som således blev fjernet fra kulturmediet sammen med, hvilket er uundgåeligt, en del af næringssubstratet, mens mikroorganismene forblev i den til kulturmediet tilbageførte mængde. Man
30 opnåede således at forøge slutkoncentrationen af mikroorganismer i kulturmediet af størrelsesordenen to til tre gange i forhold til den omtalte "batch"-fremgangsmåde. Man konstaterede imidlertid ved denne sidst omtalte fremgangsmåde, trods dens bemærkelsesværdige kvaliteter, en
35 klar reduktion af mikroorganismernes vækstgrad efter en høj begyndelsesudvikling.

Formålet med den foreliggende opfindelse har været at finde driftsbetingelser, som tillader om muligt yderligere at forøge, under anvendelse af en fremgangsmåde af denne type, slutkoncentrationen af mikroorganismer under bibeholdelse af et acceptabelt vægtudbytte i forhold til forbruget af næringssubstrater.

Det har nu overraskende vist sig, at man ved den foreliggende fremgangsmåde ifølge opfindelsen i forhold til de hidtil kendte metoder, kan opnå maximale koncentrationer af mikroorganismer (f.eks. bakterier eller gær), dvs. en maximal produktivitet samtidig med et minimalt forbrug af substrat, hvilket er af afgørende betydning for biologiske produkter, hvor udgiften til forgæringssubstrat eller næringsstoffer afhængig af det enkelte tilfælde kan udgøre 20 til 60 % af fabrikationsprisen.

Dette resultat er således opnået ved en fremgangsmåde af den i krav 1's indledning beskrevne type, og idet fremgangsmåden er ejendommelig ved det i krav 1's kendetegnende del anførte.

Hver af de i krav 1 omtalte betingelser bidrager til det forventede resultat: reguleringen til en fuldstændig konstant værdi af pH ved hjælp af et neutraliseringsmiddel har den virkning, at den tillader meget nøjagtig tilførsel af substrat og af vand. Eftersom man anvender en meget præcis opretholdelse af pH, kan man ganske simpelt styre fermenteringen ud fra kendskabet til koncentrationen af det inhiberende middel, og fordi der eksisterer en korrelation mellem denne koncentration af det inhiberende middel og vækstraten, kan man således meget let med dette hjælpemiddel efter en indledningsfase ændre tilførselsbetingelserne for vand og eventuelt for substrat for at sikre en vækstrate som er noget mere moderat, og som man vil kunne opretholde under hele fermenteringsprocessen, mens den ultrafiltreringskapacitet, der skal anvendes for

at opretholde et konstant rumfang, i sig selv er stærkt afhængig af den opretholdte vækstrate. Det er således, at en meget høj vækstrate svarer til en meget lav koncentration af det inhiberende middel, og derfor til en

5 meget stor ultrafiltreringskapacitet. Det er en af fordelene ved fremgangsmåde ifølge opfindelsen, at vækstraten for den anden udviklingsfase skal være i området 0,10 til 0,50, og som fordelagtigt er på mellem 0,15 og 0,45, endnu mere fordelagtigt mellem 0,20 og 0,40. Man har endog

10 kunnet fastslå for visse anvendelsesformer, at den optimale værdi for den mere moderate vækstrate befinder sig mellem 0,30 og 0,35. Som det er blevet præciseret, findes således for hver fastholdt vækstrate og for hver dyrket mikroorganisme en tilsvarende maximal, kritisk værdi for

15 koncentrationen af det inhiberende middel, og det er præcist, når denne maximale, kritiske værdi er blevet opnået, at man går over til at gennemføre den efterfølgende fase med en udvikling med mere moderat vækstrate.

20 Ifølge en vigtig detalje ved udøvelsen af fremgangsmåden ifølge opfindelsen, holder man tilførselsmængderne for substrater og for vand i konstante forhold til tilførselsmængden for neutraliseringsmiddel, under hele begyndelsesudviklingsfasen med høj vækstrate, og i andre ind-

25 byrdes forhold under hele den efterfølgende udviklingsfase med mere moderat vækstrate, hvor den relative tilførselsmængde af vand forøges desto mere, jo lavere man har valgt den maksimalt tilladelige koncentration af det inhiberende middel. Denne driftsmetode, som består i at

30 gennemføre en konstant drift og optimere tilførselsmængderne medfører en minimal udgift til næringssubstrat og en så perfekt tilpasning som muligt af mikroorganismernes næringsbehov til den vækst, som man beslutter at tildele dem. Skønt tilpasningen af begyndelsesfasen til den efterfølgende fase kan synes at være af beskeden betydning,

35 ville man ikke kunne opnå succes med hensyn til vægtudbyttet af mikroorganismer i forhold til substrat uden så-

dan tillem্পning.

Opfindelsen angår blandt andre muligheder dyrkning af mælkesyrebakterier, hvor man tilfører et kulturmedium, 5 der forinden er blevet podet, næringssubstrat, som mest fordelagtig indeholder lactose og gærekstrakt, samt ammoniak (eller natriumhydroxid), der udgør neutraliseringsmidlet, idet det hele er fortyndet med vand, og hvor man på kulturmediet gennemfører en behandling til delvis 10 fjernelse af ammoniumlactat (eller natriumlactat), hvilket udøves i det mindste under en del af udviklingsfasen for mælkesyrebakterierne, og som er af den type, ved hvilken man sikrer en vækstrate for bakterierne i kulturmediet, som udviser en høj værdi i en første begyndelses- 15 udviklingsfase, og i en efterfølgende fase en mere moderat, konstant værdi. Ved denne udførelsesform fastlægges ifølge opfindelsen følgende kombination af driftsbetingelser:

20 a) man regulerer under hele dyrkningsfasen tilførslen af ammoniak (eller natriumhydroxid) til opretholdelse af pH i kulturmediet på en absolut konstant værdi, der befinder sig mellem 6 og 7;

25 b) man regulerer tilførslen af substrat og af vand i forhold til den ifølge punkt a) regulerede tilførsel af ammoniak (eller natriumhydroxid) ved hjælp af bestemmelsen af koncentrationen af ammoniumlactatet (eller natriumlactat), som stammer fra indvirkningen af ammoniak (eller 30 natriumhydroxid) på den mælkesyre, som er dannet under nedbrydningen af lactosen;

c) påbegyndelsen af den mere moderate vækstfase bestemmes gennem opnåelsen af en kritisk koncentration i kulturmediet af ammoniumlactat (eller natriumlactat), idet den 35 kritiske koncentration af ammoniumlactat befinder sig mellem 19 g/l for en vækstrate på 0,50 og 54 g/l for en

vækstrate på 0,10;

- 5 d) i det mindste den essentielle fase af ultrafiltre-
ringsbehandlingen styres positivt under opretholdelse af
et konstant rumfang af kulturmediet.

10 Som man ser, drejer det sig her om en tilpasning af den
ovenfor beskrevne fremgangsmåde til en dyrkning under de
særlige betingelser, der udelukkende er rettet mod mælke-
syrebakterier. Som tidligere er det helt afgørende den
forud fastlagte vækstrate i den anden udviklingsfase (som
tillader opnåelse af en fuldstændig fermentering inden
for en fastlagt tidstermin). Til denne vækstrate svarer
15 en maksimal, kritisk koncentration af ammoniumlactat (el-
ler natriumlactat), som for øvrigt er forskellig fra den
ene bakterie til den anden. Man har således ved afprøv-
ninger på et meget stort antal stammer kunnet fastslå, at
de kritiske ammoniumlactat-koncentrationer befinder sig
20 mellem ca. 19 g/l (vækstrate 0,50) og ca. 54 g/l (vækst-
rate 0,10), mere alment imellem 25 g/l og 35 g/l. Et nød-
vendigt forarbejde ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen
er således den forudgående fastlæggelse af den kritiske
koncentration af det inhiberende middel, som er knyttet
til den valgte vækstrate.

25 Opfindelsens karakteristika og fordele vil i øvrigt frem-
gå af den efterfølgende beskrivelse, som henviser til de
vedføjede tegninger, hvori:

30 fig. 1 er en skematisk afbildning af et apparat til dyrk-
ning af mælkesyrebakterier ved fremgangsmåde ifølge op-
findelsen,

fig. 2-5 er diagrammer til fastlæggelse af vækstraten.

35 Idet der henvises til fig. 1, tilfører man til en fermen-
teringsbeholder 1, der er udstyret med et omrøringsorgan

2, i dens øvre ende 3 på den ene side et næringssubstrat (lactose og gær) stammende fra et reservoir 4 ved hjælp af en rørføring 5 forsynet med en pumpe 6 samt en volumenmåler 7, og på den anden side ammoniak til neutralisation igennem et rør 8 forsynet med en pumpe 9 og en volumenmåler 10, og endelig sterilt vand gennem en ledning 11 forsynet med en pumpe 12 og en volumenmåler 13. Fermenteringsbeholderen er ligeledes udstyret med et rør til udtømmning 20, som inkorporerer en pumpe 21, og som ender i en ultrafiltreringscelle 22 med en membran 23. Udgangen, der befinder sig på siden oven for membranen 23 i strømningsretningen fra ultrafiltreringscellen 22 er forbundet med fermenteringsbeholderen 1 gennem en ledning 24, som inkorporerer en varmeveksler 25. Et apparat 30 til måling af pH har en føler 31, som er anbragt i den nedre del af fermenteringsbeholderen 1, og som afgiver et signal ved måling af pH til en regulator 32. Regulatoren 32 sikrer ud fra denne information i hovedsagen gennem en kommandovej 34 den passende regulering af volumenet af ammoniakvandsumpen 9 eller af dennes funktionstid, således at man holder pH på en konstant og forud fastlagt værdi, som kan justeres afhængig af bakteriearten under dyrkningens forløb. Regulatoren 32 indvirker ligeledes gennem en kommandovej 35 på volumenet eller funktionstiden af substratpumpen 6, samt gennem en kommandovej 36 på volumenet eller funktionstiden af pumpen 12 for vand til fortyndning.

Ultrafiltreringscellen 22 udviser sædvanligvis en afgang på filtratsiden forbundet til udløbet ved hjælp af en ledning 40, som inkorporerer en reguleringsventil 41, der i sig selv er styret gennem en kommandovej 42 af regulatoren 32, som til dette formål modtager informationer igennem en måleledning 43 fra indikatorerne for den minimale 44, middel 45 og maximale 46 niveauhøjde. Indikatoren for middelniveauet 45, består faktisk af to adskilte følere 45a og 45b, således at man kan sikre opretholdel-

sen af et konstant højdeniveau, som det vil blive beskrevet nærmere i det efterfølgende:

Det ovenfor beskrevne apparats funktion er som følger:

5

Ved påbegyndelsen af en dyrkning af mikroorganismer sættes til fermenteringsbeholderen 1 et rumfang substrat således, at det omtrent når niveauet for højdemåleren 45. Man poder dette kulturmedium med en mælkesyrebakterie og sikrer sig ved passende midler en temperatur i størrelsesordenen 30 °C for kulturmediet, samtidig med at man opretholder en atmosfære dækkende kulturmediet med nitrogen med trykket 0,5 bar, hvorpå man starter omrøringsanordningen 2. Næringssubstratet, som befinder sig i reservoir 4, og som i hovedsagen indeholder lactose med en koncentration L_0 og gær med en koncentration E_0 , fremføres ved hjælp af pumpen 6 gennem rørføringen 5 med en hastighed D_1 (samlet mængde T_1), mens ammoniakvand med en koncentration N_0 fremføres gennem rørføringen 8 med en hastighed D_2 (total mængde T_2), mens sterilt vand fremføres igennem rørføringen 11 med en hastighed D_3 (samlet mængde T_3).

10

15

20

25

30

Under denne første fase har man på den ene side valgt koncentrationen af substratet i fermenteringsbeholderen på en forholdsvis høj værdi (lactose 45 g/l, gærekstrakt 15 g/l), og under en begyndelses første fase af udviklingen holdes koncentrationerne af lactose L_1 , gær E_1 og ammoniak N_1 , som når frem til enden af rørføringen 3 ind i fermenteringsbeholderen 1, f.eks. på 40 g/l for L_1 , 13,3 g/l for E_1 og 12 N for N_1 . Man vil bemærke, at disse koncentrationer let lader sig bestemme ud fra kontrolpanelet 50, som modtager registreringerne fra måleanordningerne 7, 10 og 13.

35

Under hele denne driftsfase er det vigtigt til opnåelse af en god afvikling af fremgangsmåden regelmæssigt at

kontrollere vækstraten, som bør være så høj som mulig.

Denne vækstrate i den eksponentielle fase, hvori man be-
finder sig under hele varigheden af fremgangsmåden til
5 dyrkningen, er udtrykt ved den biologiske masses konstan-
te logaritmiske tilvækst under udviklingen i afhængighed
af tiden ifølge den kendte formel $X = X_0 e^{\mu t}$ (hvor μ be-
tyder vækstraten) og man påviser i øvrigt, når det drejer
sig om det valgte eksempel, at det ammoniumlactat, der
10 dannes ved foreningen mellem mælkesyre (stammende fra
forbruget af lactose) og det tilførte ammoniak, er knyt-
tet til vækstraten gennem forholdet:

$$15 \quad \text{Lg}_n \frac{dL}{dt} = \mu \cdot t \text{ konst.})$$

og man bemærker, at eftersom koncentrationsbestemmelsen
med hensyn til ammoniumlactat er direkte proportional med
tilførslen af ammoniak (for et kulturmedium med konstant
20 pH-værdi) er det tilstrækkeligt at notere sig variationen
i tilførselsmængden af ammoniak for at bestemme vækstra-
ten som én funktion af tiden:

$$25 \quad \mu = \text{Lg} \frac{dL}{dt} / t.$$

Det er således klart, at man til ethvert tidspunkt kan
følge og, ved hjælp af en grafisk afbildning af

$$30 \quad \text{Lg}_n \frac{dL}{dt} = \mu t + \text{konst.},$$

den eventuelle variation i vækstraten, som er afbildet
ved den således optegnede kurves hældning, samt at man

ved passende korrektioner omvendt kan opretholde denne vækstrate konstant på en forud fastlagt værdi ved korri-gerende regulering af tilførslerne af substrat og af vand i forhold til tilførslen af neutraliseringsmiddel.

5

Under hele denne første behandlingsfase er pumpen 21 i ultrafiltreringskredsløbet ude af funktion, og kulturme-diets højde hæves progressivt fra det niveau, som er in-dikeret ved hjælp af indikatoren 45 op til det niveau, som er indikeret ved hjælp af indikatoren 46 (maximalt rumfang). Det er først når dette niveau 46 er blevet op-nået, at regulatoren 32 via kommandovejen 42 iværksætter den regulerede åbning af ventilen 41, hvilket muliggør at ultrafiltratet fjernes og ultrafilteringen i praksis påbegyndes.

15

De inhiberende midler, såsom ammoniumlactat, fjernes så-ledes på kendt måde hen over ultrafiltreringsmembranen 23, mens omvendt mælkesyrebakterierne tilbageføres gennem rørføringen 24 til fermenteringsbeholderen 1. Kulturme-diets højdeniveau reduceres hurtigt, indtil det når det mellemliggende niveau, som er kontrolleret af indikatoren 45, og når først dette niveau er blevet opnået, program-meres regulatoren 32 således, at ventilen 41 lukkes no-get, således at man sikrer et næsten konstant niveau ved hjælp af de to niveaufølere i mellemhøjden, som er place-ret i ringe afstand fra hinanden 45a og 45b.

20

25

30

35

Man har under hele denne periode sikret sig en kontrol af operationerne især af vækstraten, som, således som man har set det, bestemmes ved den logaritmiske ændring i forhold til tiden af ammoniumlactatkonzentrationen i fer-menteringsbeholderen. Når man først har nået en maximal koncentration af lactat, som er blevet fastlagt fra be-gyndelsen, som svarer til bakteriedyrkningen ved en fast-lagt vækstrate, griber man ind således, at denne ammoni-umlactatkonzentration holdes konstant, hvilket har den

virkning, at man holder vækstraten for bakterierne konstant. Til opnåelse heraf forøger man, såsnart denne maksimale værdi for koncentrationen af ammoniumlactat er blevet opnået, i nogen udstrækning tilstrømningsmængden af vand, som tilledes gennem pumpen 12, således at man i fermenteringsbeholderen indfører ammoniakmængder, som svarer meget nøjagtigt til den konstante vedligeholdelse af ammoniumlactatkoncentrationen. Man kan let bestemme tilførselshastigheden D_3 for pumpen 12, således at den ammoniakkoncentration, som indføres, er den, der svarer til den koncentration i fermenteringsbeholderen af ammoniumlactat, som på denne måde sikrer opretholdelsen.

Man kan således være sikker på at holde vækstraten på et nøjagtigt konstant niveau, om ønsket gennem kompletterende regulering af tilførslen af substrat, idet man til stadighed holder pH konstant. Det skal her bemærkes, at iværksættelsen af ultrafiltreringsfasen er styret positivt ved, at kulturmediets niveau, som registreres ved hjælp af niveaumåleren 46, således at ultrafiltreringen i påkommende tilfælde kan ske forinden eller kan følge efter modifikationer i tilførselsforholdene, som afledes af fastlæggelsen af et mere moderat vækstrateniveau af mælkesyrebakterierne.

I det efterfølgende skal anføres, som eksempel på en gennemførelse for visse mælkesyrebakterier, de kritiske koncentrationer af ammoniumlactat for en vækstrate på 0,35, idet der til beskrivelse af bakterierne er anført følgende vedrørende deres oprindelse:

ANRZ: bakterier, der kan fås fra "Centre National de Recherches de Zootechniques" i Jouy-en-Josas (Frankrig);

NCDO: bakterier, der kan fås fra "National Collection of Dairy Organisms" i Reading (England) og :

(S.L.) betyder "Streptococcus lactis"

(S.Cr) betyder "Streptococcus cremoris"

5 (S.D.) betyder "Streptococcus diacetyl lactis".

		Kritisk koncentration ($\mu = 0,35$)
		<u>(ammoniumlactat)</u>
10	CNRZ 269 (SL)	30 g/l
	NCDO 763 (SL)	26 g/l
	CNRZ 29 (SL)	38 g/l
	NCDO 505 (SL)	38 g/l
	NCDO 1198 (SL)	26 g/l
15	CNRZ 116 (SCr)	23 g/l
	NCDO 1009 (SCr)	21 g/l
	NCDO 699 (SCr)	26 g/l
	CNRZ 253 (SCr)	30 g/l
	NCDO 1000 (SCr)	21 g/l
20	NCDO 1119 (SCr)	28 g/l
	NCDO 495 (SCr)	38 g/l
	CNRZ 124 (SD)	28 g/l
	CNRZ 125 (SD)	32 g/l

25 Man går i almindelighed ud fra substrater i reservoiret 4 med den højest mulige koncentration, i størrelsesordenen:

(Lo) = 240 g/l (lactose)

(Ei) = 80 g/l (gærekstrakt)

ammoniak (No) = 12 N (normalitet)

30

Man kan i hvert enkelt tilfælde bestemme koncentrationerne af produkter, der går ind i fermenteringsbeholderen 1; men ligeledes og frem for alt indholdet af lactat til ethvert tidspunkt ved hjælp af formlen:

35

$$(\text{lactat}) = \frac{T_2 \times 107,11 \times N_o}{V_o + T_1 + T_2 + T_3}$$

hvor T_1 = summen af substrat rumfang

5 T_2 = summen af ammoniakvands rumfang

T_3 = summen af vandrumfang

V_o = det oprindelige rumfang i fermenteringsbeholderen

107,11 = molekylvægten for ammoniumlactat.

10 Man gennemfører overgangen fra den første begyndelsesfase med høj vækstrate til den anden fase med mere moderat vækstrate simpelthen ved at forøge tilførselshastigheden af vand D_3 , således at man afpasser koncentrationen af det indgående ammoniakvand til koncentrationen af ammoniumlactat i fermenteringsbeholderen, hvortil anvendes
15 den følgende matematiske formel:

$$20 \quad D_3 = \frac{(N_o) \times 107,11 \times D_2}{\text{Lactat}} - (D_1 + D_2)$$

ligesom man på det tidspunkt om ønsket modificerer tilførslen lidt af substrat i overensstemmelse med ændringen i vækstraten.

25 I det følgende skal gives en kortfattet gennemgang af figurerne 2 til 5, som er diagrammer visende vækstraten som funktion af tiden:

30 Fig. 2, som angår stammen CNRZ 269, viser en høj vækstrate af størrelsesordenen 0,77 under de første 3 timer. Efter 5 timer og 30 minutters forløb er lactatindhold nået op på 30 g/l, og fra dette øjeblik har man modificeret tilførelsen af vand ved at forøge den med ca. 50 %, hvilket har haft den virkning at reducere ammoniakkoncentra-

tionen, hvorved der sikres en tilførsel af ammoniak til fermenteringsbeholderen, som er egnet til at holde denne koncentration på 30 g/l, som svarer til en vækstrate på 0,39 fra tidspunktet 5 timer og 30 minutter til 8 timer.

5 Man bemærker, at ultrafiltreringen er sat i gang en lille smule efter 4 timer. Efter fermenteringens afslutning er den opnåede koncentration af bakterier 32 g bakterietørstof pr. kg kultur. Substratseffektivitetsfaktoren er 7,5 kg lactose pr. kg bakterietørstof.

10

På fig. 3, som angår stammen CNRZ 116, bemærker man en høj vækstrate af størrelsesordenen 0,71 pr. time under de første 4 timer. Efter 5 timer har indholdet af lactat nået 24 g/l, og fra dette øjeblik har man modificeret
15 tilførslen af vand, idet man forøger den med 98 %, hvilket har til effekt at reducere ammoniakkoncentrationen, og således sikre en tilførsel af ammoniak til fermenteringsbeholderen, som er i stand til at holde denne koncentration på 24 g/l, som svarer til en vækstrate på 0,30
20 i timen fra tiden 5 timer til 9 timer. Man bemærker, at ultrafiltreringen er igangsat en lille smule før tiden 5 timer. Man har forøget tilførselshastigheden af substrat med 7 % før den 7. time. Efter fermentering var bakteriekoncentrationen 20 g bakterietørstof pr. kg kultur. Substrateffektivitetsfaktoren er 8,4 kg lactose pr. kg bakterietørstof.
25

På fig. 4, som angår bakteriestammen NCDO 1119, bemærker man en høj vækstrate af størrelsesordenen 0,70 under de
30 første 4 timer. Ved den 6. time har lactatindholdet nået 28 g/l, og fra dette tidspunkt ændrer man tilførslen af vand, ved at forøge den med 66 %, hvilket har haft til virkning at reducere koncentrationen af ammoniak, og således sikre en tilførsel af ammoniak til fermenteringsbeholderen, som er i stand til at holde denne koncentration
35 på 28 g/l, som svarer til en vækstrate på 0,32, fra den 6. time til den 11. time. Man bemærker, at ultrafiltre-

ringen er blevet iværksat hen imod den 7. time. Ved fermenteringens afslutning er bakteriekoncentrationen 26 g bakterietørstof pr. kg kultur. Substrateffektivitetsfaktoren er 9,2 kg lactose pr. kg bakterietørstof.

5

På fig. 5, som angår stammen CNRZ 125, bemærker man en høj vækstrate af størrelsesordenen 0,80 under de 5 første timer. En lille smule før den 8. time nåede lactatindholdet 32 g/l, og fra dette tidspunkt modificerede man tilførslen af vand, idet man forøgede den med ca. 42 %, hvilket havde til effekt at reducere ammoniakkoncentrationen og på denne måde sikre en tilførsel af ammoniak til fermenteringsbeholderen, som var i stand til at vedligeholde denne koncentration på 32 g/l, hvilket svarer til en vækstrate på 0,26, fra den 8. time til den 12. time. Man bemærker, at ultrafiltreringen blev iværksat før den 7. time. Efter fermenteringens afslutning er bakteriekoncentrationen 18 g bakterietørstof pr. kg kultur. Substrateffektivitetsfaktoren er 7,9 kg lactose pr. kg bakterietørstof.

10
15
20

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen finder anvendelse ved dyrkning af mikroorganismer især ved dyrkningen af mælkesyrebakterier til mange forskellige anvendelser inden for osteindustrien, druevinindustrien etc.

25

30

35

P a t e n t k r a v:

1. Fremgangsmåde til dyrkning af mikroorganismer, hvor
5 man til et i forvejen podet kulturmedium sætter nærings-
substrat og et neutraliseringsmiddel, som er beregnet til
at holde kulturmediets pH konstant, alt fortyndet med
vand, og hvor man på kulturmediet gennemfører ultrafil-
trering til delvis fjernelse af et dannet, inhiberende
10 middel under i det mindste en del af mikroorganismernes
udviklingsfase, idet man sikrer en vækstrate for mikroor-
ganismerne i kulturmediet udvisende en høj værdi i en
første fase af begyndelsesudviklingen samt i en efterføl-
gende fase en moderat og konstant værdi, k e n d e-
15 t e g n e t ved, at man:

- a) holder pH på 5,5-7,5 under hele dyrkningsfasen;
- b) regulerer tilførslen af substrat og af vand i forhold
20 til tilførslen af neutraliseringsmiddel ved en stadig
analyse af koncentrationen af det inhiberende middel, som
er resultatet af neutraliseringsmidlets virkning;
- c) indfører alle nævnte komponenter direkte i en fermen-
25 teringsbeholder under hele fremstillingen;
- d) holder den moderate vækstrate mellem 0,10 og 0,50;
- e) bestemmer påbegyndelsen af dyrkningsfasen med moderat
30 vækstrate ved opnåelse af en kritisk koncentration af det
inhiberende middel i kulturmediet svarende til den maxi-
malt tilladelige koncentration ved den valgte moderate
vækstrate, og
- f) styrer i det mindste den væsentlige fase af ultrafil-
35 treringen således, at der opretholdes et konstant rumfang
af kulturmediet, hvori den samlede mængde dyrkede mikro-

organisme befinder sig.

2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at den mere moderate vækstrate er mellem 0,15 og 0,45.

3. Fremgangsmåde ifølge krav 2, k e n d e t e g n e t ved, at den mere moderate vækstrate er mellem 0,20 og 0,40.

4. Fremgangsmåde ifølge krav 3, k e n d e t e g n e t ved, at den mere moderate vækstrate er mellem 0,30 og 0,35.

5. Fremgangsmåde ifølge ethvert af kravene 1-4, k e n d e t e g n e t ved, at mængden af substrat og vand holdes på konstante værdier i forhold til mængden af neutraliseringsmiddel under den første udviklingsfase med høj vækstrate samt på andre indbyrdes forholdsværdier under hele den efterfølgende udviklingsfase med mere moderat vækstrate, under hvilken den relative mængde af vandet forøges desto mere, jo svagere man vælger den maximalt tilladelige koncentration af inhiberende middel.

6. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at man før ultrafiltreringen gennemfører en forudgående udviklingsfase af kulturmediet med voksende rumfang ud fra et begyndelsesrumfang, indtil man opnår det maksimale rumfang, hvorpå man iværksætter ultrafiltreringen.

7. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at ultrafiltreringen først bevirker en rumfangsreduktion af kulturmediet, hvorpå der opretholdes en konstant middelværdi af dette således reducerede rumfang af kulturmediet.

8. Fremgangsmåde ifølge krav 7, k e n d e t e g n e t ved, at man, når ultrafiltreringen er afsluttet, fortsætter tilførslerne til kulturmediet indtil opnåelse af et niveau, der svarer til det maximale rumfang.

5

9. Fremgangsmåde til dyrkning af mælkesyrebakterier, hvor man til et i forvejen podet kulturmedium sætter næringssubstrat, der med fordel indeholder lactose og gær, og ammoniak eller natriumhydroxid, der udgør et neutraliseringsmiddel, som er beregnet til at holde kulturmediets pH på en konstant værdi, alt fortyndet med vand, og hvor man underkaster kulturmediet ultrafiltering til delvis fjernelse af dannet ammonium- eller natriumlactat under i hvert fald en del af udviklingsfasen for mælkesyrebakterierne, og hvorved man sikrer sig en vækstrate for bakterierne i kulturmediet udvisende en høj værdi i en første fase af begyndelsesudviklingen samt i en efterfølgende fase en mere moderat og konstant værdi, k e n d e t e g n e t ved, at man:

20

a) holder pH i kulturmediet på en værdi mellem 6 og 7;

25

b) regulerer tilførslen af substrat og af vand i forhold til tilførsel af ammoniak eller natriumhydroxid forudreguleret, som angivet under a), ved en stadig analyse af koncentrationen af ammonium- eller natriumlactat fremkommet ved ammoniakkens eller natriumhydroxidets virkning på den under lactosenedbrydningen dannede mælkesyre;

30

c) indfører alle nævnte komponenter direkte i en fermenteringsbeholder under hele fremstillingen;

d) holder den moderate vækstrate mellem 0,10 og 0,50;

35

e) bestemmer påbegyndelsen af dyrkningsfasen med mere moderat vækstrate ved opnåelse af en kritisk koncentration af ammonium- eller natriumlactat i kulturmediet, idet den

kritiske ammoniumlactatkoncentration er på mellem 19 g/l for en vækstrate på 0,50 og 54 g/l for en vækstrate på 0,10, og

- 5 f) styrer i det mindste den væsentlige fase af ultrafiltreringen således, at der opretholdes et konstant rumfang af kulturmediet, hvori den samlede mængde dyrkede mikroorganismer befinder sig.
- 10 10. Fremgangsmåde ifølge krav 9, k e n d e t e g n e t ved, at lactosekoncentrationen i kulturmedier under udviklingsfasen med mere moderat vækstrate er på mellem 50 g/l (svarende til en vækstrate på 0,10) og 18 g/l (svarende til en vækstrate på 0,50), og at gærekstraktkoncentrationen er på mellem 8 g/l (svarende til en vækstrate på 0,10) og 18 g/l (svarende til en vækstrate på 0,50), idet ammoniakkoncentrationen er mellem 0,5 N (svarende til en vækstrate på 0,10) og 0,18 N (svarende til en vækstrate på 0,50).

20

25

30

35

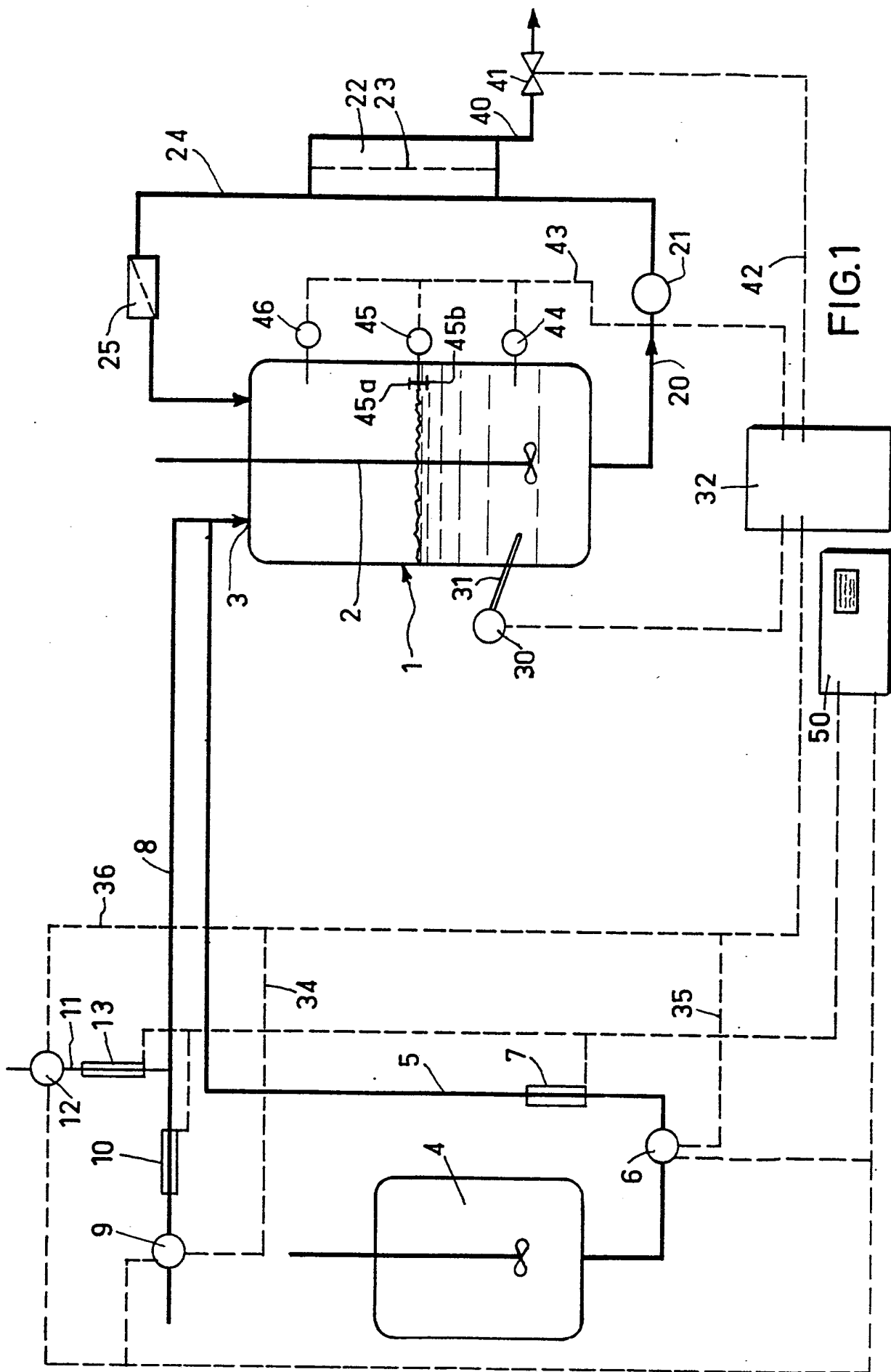


FIG. 1

